

New antibacterial peptide, moricin, from silkworms**Publication number:** FR2723951**Publication date:** 1996-03-01**Inventor:** HARA SEIICHI**Applicant:** AGRICULTURE FORESTRY AND FISHE (JP)**Classification:****- international:**

A23L3/3526; A01N37/46; A01N63/00; A01N63/02;
A61K38/00; A61P31/04; C07K14/435; C07K19/00;
C12N1/21; C12N15/09; C12P21/02; C12R1/19;
A23L3/3463; A01N37/44; A01N63/00; A01N63/02;
A61K38/00; A61P31/00; C07K14/435; C07K19/00;
C12N1/21; C12N15/09; C12P21/02; (IPC1-7):
C07K14/435; A61K38/16; C12N15/12

- European:

A01N37/46; A01N63/00; C07K14/435A4E

Application number: FR19950010268 19950831**Priority number(s):** JP19940207342 19940831; JP19950125440 19950524**Also published as:**

US5646014 (A1)

JP8119995 (A)

DE19532001 (A1)

[Report a data error here](#)

Abstract not available for FR2723951

Abstract of corresponding document: **DE19532001**

New antibacterial peptide (A) has the amino acid sequence (I) or an homologous sequence with one or more amino acid addns., deletions or substitutions. AKIPIKAIKT VGKAVGKGLR AINIASTAND VFNFLKPKKR KH (I). Also claimed are: (1) genes encoding (A), (2) recombinant DNA comprising the genes in a vector; and (3) host cells contg. this recombinant DNA.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

⑪ N° de publication : **2 723 951**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

⑫ N° d'enregistrement national : **95 10268**

⑬ Int Cl : C 07 K 14/435, C 12 N 15/12, A 61 K 38/16

⑫ **DEMANDE DE BREVET D'INVENTION**

A1

⑭ Date de dépôt : 31.08.95.

⑮ Priorité : 31.08.94 JP 20734294; 24.05.95 JP 12544095.

⑯ Date de la mise à disposition du public de la demande : 01.03.96 Bulletin 96/09.

⑰ Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire : *Ce dernier n'a pas été établi à la date de publication de la demande.*

⑱ Références à d'autres documents nationaux apparentés :

⑴ Demandeur(s) : **AGRICULTURE FORESTRY AND FISHERIES TECHNICAL INFORMATION SOCIETY — JP.**

⑵ Inventeur(s) : **HARA SEICHI.**

⑶ Titulaire(s) :

⑷ Mandataire : **CASALONGA ET JOSSE.**

⑸ **PEPTIDE, AGENT ANTIBACTERIEN CONTENANT CE PEPTIDE, GENE DE CE PEPTIDE, ADN RECOMBINE CONTENANT CE GENE ET PROCEDE DE PREPARATION DE CE PEPTIDE.**

⑹ La présente invention concerne un nouveau peptide représenté par la séquence d'acides aminés appelée "séquence n°1" dans l'annexe intitulée "Séquences de peptides et d'ADN", un agent antibactérien contenant ce peptide comme ingrédient actif, un nouveau gène codant ce peptide, un nouvel ADN recombiné contenant ce gène et un procédé de production de ce peptide.

Le nouveau peptide de la présente invention possède une activité antibactérienne efficace contre diverses bactéries Gram-négatives ou Gram-positives, y compris *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus* qui sont des bactéries pathogènes provoquant des intoxications alimentaires. Par conséquent, ce peptide est utilisable comme agent conservateur de denrées alimentaires, ainsi que comme agent antibactérien à usage médical.

FR 2 723 951 - A1



Applicants: Peter David East and Susan Elizabeth Brown
U.S. Serial No.: 10/590,539
Filed: as §371 national stage of PCT/AU2005/000234
Exhibit 9



Peptide, agent antibactérien contenant ce peptide, gène de ce peptide, ADN recombiné contenant ce gène et procédé de préparation de ce peptide.

La présente invention concerne un nouveau peptide que l'on trouve dans l'hémolymphe de vers à soie chez lesquels on a provoqué l'apparition d'une activité antibactérienne, un agent antibactérien comprenant ce peptide comme ingrédient actif, un nouveau gène codant ce peptide, un ADN recombiné comprenant ce gène et un procédé de préparation de ce nouveau peptide.

Lorsque des bactéries envahissent les cavités corporelles d'un insecte, c'est-à-dire son coelome, l'une des réactions de défense biologique de cet insecte consiste à produire dans son hémolymphe des protéines ou peptides antibactériens. En tant que protéines ou peptide antibactériens que l'on peut extraire de l'hémolymphe de vers à soie, on connaît un lysozyme, des cécropines, etc. Mais ce lysozyme ne présente d'activité antibactérienne que contre une gamme extrêmement limitée de bactéries Gram-positives, comme les bactéries du genre *Micrococcus*. Quant aux cécropines, elles présentent une activité antibactérienne contre diverses bactéries Gram-négatives ou Gram-positives, mais le problème est qu'elles ne présentent pas d'activité antibactérienne efficace contre des bactéries pathogènes provoquant des intoxications alimentaires, comme *Staphylococcus aureus* et *Bacillus Cereus*.

L'un des buts de la présente invention est donc de fournir un nouveau peptide, ainsi qu'un agent antibactérien contenant ce peptide comme ingrédient actif. Un autre but de la présente invention consiste à proposer un procédé permettant de produire efficacement ce peptide selon les techniques du génie génétique.



La demanderesse a réussi à isoler, à partir de l'hémolymph de vers à soie chez lesquels on avait provoqué l'apparition d'une activité antibactérienne, un nouveau peptide antibactérien qui présente une excellente activité antibactérienne contre *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, etc. En outre, la Demanderesse a mis au point un procédé permettant de produire efficacement ce nouveau peptide selon des techniques de génie génétique. C'est ainsi que la présente invention a été mise au point.

La présente invention fournit par conséquent :

- (1) un nouveau peptide présentant
 - (a) la séquence d'acides aminés appelée "Séquence N°1" dans l'annexe intitulée "Séquences de peptides et d'ADN", ou
 - (b) une séquence d'acides aminés homologue de la Séquence n°1, mais qui comporte, par rapport à celle-ci, une ou plusieurs additions, délétions ou substitutions d'un ou de plusieurs résidus d'acide aminé, et qui présente une activité antibactérienne;
- (2) un agent antibactérien comprenant ce peptide comme ingrédient actif;
- (3) un nouveau gène de peptide codant
 - (a) la séquence d'acides aminés appelée "Séquence N°1" dans l'annexe intitulée "Séquences de peptides et d'ADN", ou
 - (b) une séquence d'acides aminés homologue de la Séquence n°1, mais qui comporte, par rapport à celle-ci, une ou plusieurs additions, délétions ou substitutions d'un ou de plusieurs résidus d'acide aminé, et qui présente une activité antibactérienne;
- (4) un ADN recombiné, que l'on obtient en insérant ce gène de peptide dans un ADN vecteur; et
- (5) un procédé de production d'un nouveau peptide, qui comporte le fait de cultiver, dans un milieu, une bactérie qui appartient au genre *Escherichia* et qui héberge cet ADN recombiné, et le fait de récupérer le peptide dans la culture.

On peut préparer le nouveau peptide de la présente invention, appelé ci-après "moricine", par exemple à partir de l'hémolymph de vers à soie chez lesquels on a provoqué l'apparition d'une activité antibactérienne, selon des procédés classiques d'isolement d'une protéine.



Autrement, on peut préparer la moricine selon des techniques classiques de synthèse de peptides ou selon des techniques classiques de génie génétique.

5 Comme technique de génie génétique, on peut citer par exemple un procédé de production d'un nouveau peptide au moyen d'une cellule hôte que l'on soumet à une transformation ou à une transduction à l'aide d'un ADN recombiné dans lequel a été inséré un nouveau gène de peptide et un procédé de production de moricine par traduction de l'ADN recombiné dans un système non cellulaire de synthèse de protéines, à l'aide de
10 réticulocytes de lapin, de germes de blé ou autres systèmes semblables.

On va maintenant décrire en détail le procédé permettant d'isoler de la moricine à partir de l'hémolymph de vers à soie chez lesquels on a provoqué l'apparition d'une activité antibactérienne, ainsi que le procédé permettant de produire de la moricine en utilisant des techniques de génie
15 génétique.

1) Procédé d'isolement de la moricine à partir d'hémolymph de vers à soie où l'on a provoqué l'apparition d'une activité antibactérienne.

20 Le produit de départ utilisé pour obtenir de la moricine peut être n'importe quel type d'hémolymph de vers à soie où l'on a provoqué l'apparition d'une activité antibactérienne. Pour provoquer l'apparition d'une activité antibactérienne, on peut par exemple mettre en oeuvre un procédé dans lequel on injecte, dans la cavité corporelle de larves de vers à soie, une suspension d'*E. coli* dans du sérum physiologique. 18 à 24 heures après cette opération, on incise les pattes des larves de vers à soie, afin
25 de recueillir leur hémolymph par ces orifices. Après l'avoir chauffée, on soumet cette hémolymph à une centrifugation, ce qui donne un surnageant.

30 On soumet ensuite le surnageant ainsi obtenu à une opération de relargage à l'aide d'un sel, pour laquelle on peut utiliser par exemple du sulfate d'ammonium, du sulfate de sodium, du sulfate de magnésium, etc. On ajoute ce sel au surnageant en une quantité correspondant à de 15 à 75% de la saturation, et l'on récupère le précipité qui en résulte. Ensuite, on dissout ce précipité dans de l'eau distillée, ou dans un tampon contenant de
35 l'acétate d'ammonium, etc. et on soumet cette solution à une filtration sur



gel. Grâce à cette opération, on fractionne des protéines et on les dessale. Le milieu dans lequel on opère cette filtration sur gel peut être n'importe quel milieu utilisé classiquement en filtration sur gel. On peut citer, à titre d'exemple, les gels Sephadex G-50, G-75 et G-100 (Pharmacia Fine Chemical), et Toyopearl HW-55 (Tosoh Corp.).

On soumet ensuite les fractions protéiques à faible masse moléculaire, obtenues par filtration sur gel, à une chromatographie sur une colonne échangeuse de cations. Comme exemples de milieu échangeur de cations, on peut citer CM Sepharose FF (Pharmacia Fine Chemical) et CM Toyopearl 650 (Tosoh Corp.).

Parmi les fractions adsorbées sur la colonne échangeuse de cations, on soumet la fraction qui présente l'activité antibactérienne la plus forte à une chromatographie en phase liquide haute performance, à l'aide d'une colonne à polarité de phases inversée (cette opération sera appelée ci-après "HPLC à polarité de phases inversée"). A titre d'exemples de colonnes à polarité de phases inversée utilisées pour cette opération, on peut citer les colonnes Capcell Pak C8 SG300 et C18 SG300 (Shiseido Co., Ltd.). Les fractions adsorbées sur la colonne à polarité de phases inversée peuvent être éluées avec un mélange à gradient de densité d'eau et d'acétonitrile contenant de l'acide trifluoroacétique.

Parmi les fractions ainsi obtenues, on soumet à nouveau la fraction présentant l'activité antibactérienne la plus forte à une HPLC à polarité de phases inversée, pour isoler ainsi la moricine.

On peut mesurer l'activité antibactérienne des fractions obtenues au cours du procédé d'isolement et de purification décrit ci-dessus en utilisant comme indicateur l'apparition, sur une plaque de gélose, d'une zone où est inhibée la prolifération d'une souche bactérienne d'essai, par exemple la souche ATCC 6538P de *Staphylococcus aureus*, sous-espèce *aureus*.

2) Procédé de production de moricine selon des techniques de génie génétique.

On décrit ci-dessous un procédé de production de la moricine, qui comprend la transformation ou la transduction d'une cellule hôte à l'aide d'un ADN recombiné dans lequel a été inséré un ADN contenant le



gène de moricine, et le fait de faire produire de la moricine par le microorganisme de recombinaison ainsi obtenu.

5 On peut obtenir un ADN contenant le gène de moricine en clonant un gène naturel de moricine dérivé de l'ADN génomique ou de l'ADNc du ver à soie. On peut amplifier cet ADN contenant le gène de moricine en synthétisant un jeu d'amorces d'ADN basé sur la séquence d'acides aminés de la moricine, et en les soumettant ensuite à une opération de PCR (réaction en chaîne de polymérase). On peut également construire un ADN contenant le gène de moricine par synthèse chimique.

10 Il faut noter que la séquence d'acides aminés codée par un gène de moricine peut comporter une ou plusieurs additions, délétions ou substitutions d'un ou plusieurs résidus d'acide aminé, pourvu que la séquence d'acides aminés conserve une activité antibactérienne. Tous les gènes de moricine codant des séquences d'acides aminés modifiées dans une mesure telle que l'activité antibactérienne n'est pas éliminée sont inclus dans le cadre de la présente invention.

15 Il est préférable que chaque extrémité de l'ADN contenant le gène de moricine soit munie d'un site reconnaissable par une enzyme de restriction appropriée, comme *EcoRI* ou *SalI*. Quand l'ADN comporte de tels sites de reconnaissance, on peut insérer cet ADN dans un ADN vecteur avec efficacité.

20 Lorsqu'on synthétise chimiquement un ADN contenant un gène de moricine, on synthétise l'ADN sous la forme de plusieurs oligonucléotides. Après hybridation, ces oligonucléotides sont ligaturés à l'aide d'une ADN ligase. Dans ce cas, il est préférable que certains codons soient remplacés par d'autres codons qui ne modifient pas la séquence d'acides aminés de la moricine, mais qui sont souvent utilisés dans la cellule hôte que l'on souhaite employer. En suivant ces principes, on parvient à produire de plus grandes quantités de moricine qu'avec un gène naturel de moricine.

25 30 On peut facilement amplifier un ADN contenant un gène de moricine, selon le procédé décrit ci-dessous. En résumé, on insère l'ADN dans un ADN vecteur approprié, par exemple un ADN de plasmide ou un ADN de bactériophage, ce qui donne un ADN recombiné. On soumet ensuite une cellule hôte comme *Escherichia coli* JM109 (Takara Shuzo Co., Ltd.) à une transformation ou à une transduction, en utilisant cet ADN

35



recombiné, et l'on obtient ainsi un microorganisme de recombinaison que l'on cultive. Après y avoir récupéré l'ADN recombiné selon des procédés classiques, on découpe l'insert d'ADN à l'aide d'enzymes de restriction appropriées, puis on purifie l'insert d'ADN ainsi obtenu. Incidemment, lorsque l'on prépare un ADN recombiné à partir d'un microorganisme de recombinaison, il est préférable de confirmer la séquence de bases de l'insert d'ADN selon le procédé de terminaison de chaîne aux didésoxy [Methods Enzymol., 101:20-78 (1983)] ou selon un procédé similaire.

La cellule hôte utilisée pour produire de la moricine peut être soit une cellule eucaryote, soit une cellule procaryote. Des exemples de cellules eucaryote sont des cellules d'animaux, de plantes, d'insectes ou de levure, et des exemples de cellules procaryotes sont des cellules d'*E. coli*, de *Bacillus subtilis* et d'*Actinomycetes*.

Quand on utilise comme cellule hôte une cellule végétale ou une cellule d'insecte, il n'est pas nécessaire que cette cellule soit une cellule cultivée; on peut utiliser comme hôte un organisme végétal ou l'organisme d'un insecte, par exemple un plant de tabac ou une larve de ver à soie.

Dans le cas où l'on produit un peptide antibactérien, comme de la moricine, dans une cellule procaryote comme *E. coli*, il est préférable que le peptide intéressant soit exprimé sous la forme d'une protéine de fusion avec la β -galactosidase, la β -lactamase, la protéine fixant le maltose, la protéine A, ou un autre protéine similaire. Comme un peptide tel que la moricine, exprimé sous cette forme, ne présente pas d'activité antibactérienne, il n'empêche pas la prolifération de la cellule hôte procaryote. On peut citer, comme exemples concrets de cellules procaryotes que l'on peut utiliser comme hôtes dans le cadre de la présente invention, *Escherichia coli* JM109, *Escherichia coli* HB101 (ATCC 33694).

On peut facilement purifier un peptide antibactérien exprimé sous forme de protéine de fusion, par chromatographie d'affinité lorsque la protéine de fusion est soluble, ou bien par centrifugation lorsque cette protéine de fusion est insoluble.

L'ADN vecteur utilisé pour l'expression d'un peptide de type moricine peut être n'importe quel ADN vecteur, pourvu qu'il soit capable de se répliquer dans une cellule hôte. On peut utiliser par exemple un ADN plasmidique ou un ADN de bactériophage. Lorsque la cellule hôte est



E. coli, on peut utiliser des plasmides tels que pMAL-C2 (New England Labs.), pGEX-5X-1 (Pharmacia) et pXa1 (Boehringer Mannheim).

On insère alors l'ADN contenant le gène de moricine dans un ADN vecteur, entre des sites de coupure par des enzymes de restriction appropriées, et l'on prépare ainsi un ADN recombiné. Lorsque l'on utilise le plasmide pXa1 comme ADN vecteur, on fait digérer ce plasmide par des enzymes de restriction, comme *EcoRI* et *SalI*, et l'on obtient ainsi des fragments d'ADN vecteur auxquels on mélange ensuite l'ADN contenant un gène de moricine. On fait ensuite réagir le mélange ainsi obtenu avec une ADN ligase, comme l'ADN ligase de T4, et l'on obtient ainsi un ADN recombiné.

On peut obtenir un microorganisme de recombinaison par transformation ou transduction d'une cellule hôte à l'aide de l'ADN recombiné indiqué ci-dessus. La transformation d'une cellule hôte peut être réalisée selon le procédé de D. M. Morrison [Methods Enzymol., 68:326-331 (1979)], le procédé au chlorure de calcium [Gene, 6:23 (1979)] ou un autre procédé semblable, et la transduction d'une cellule hôte peut être réalisée selon le procédé de B. Hohn [Methods Enzymol., 68:299-309 (1979)] ou un autre procédé semblable.

Ensuite, on cultive dans un milieu le microorganisme de recombinaison ainsi obtenu, et on récupère la moricine dans la culture.

Lorsque la moricine est exprimée, non pas sous la forme d'une protéine de fusion, mais sous la forme du peptide constituant la moricine elle-même, à l'aide d'une cellule eucaryote utilisée comme cellule hôte, on peut récupérer le peptide qu'est la moricine selon des techniques classiques d'isolement de protéines. En résumé, on rompt les parois des cellules par un traitement de lyse réalisé à l'aide d'un détergent, une sonication, un traitement de broyage ou un traitement similaire, pour libérer la moricine des cellules. Ensuite, en mettant en œuvre des procédé semblables à ceux que l'on utilise pour isoler la moricine à partir de l'hémolymph de vers à soie, c'est-à-dire par filtration sur gel, échange d'ions et HPLC à polarité de phases inversée, on peut obtenir un produit standard qui est de la moricine très pure.

Lorsque la moricine est exprimée sous la forme d'une protéine de fusion par une cellule procaryote ou eucaryote utilisée comme cellule



hôte, on récupère cette protéine de fusion en combinant plusieurs traitements, comme une centrifugation et une chromatographie d'affinité, effectuées après la rupture des parois des cellules. Puis le peptide qu'est la moricine est coupé de la protéine de fusion, par un traitement chimique
5 avec du bromure de cyanogène ou un composé similaire, ou par traitement enzymatique avec du facteur Xa (Boehringer Mannheim) ou un autre produit semblable. La moricine ainsi obtenue est alors purifiée.

Une moricine obtenue selon des techniques de génie génétique présente une activité antibactérienne parfaitement identique à celle que
10 présente une moricine isolée à partir de l'hémolymph de vers à soie chez lesquels on a provoqué l'apparition d'une activité antibactérienne.

La moricine peut présenter une activité antibactérienne contre de très diverses bactéries, y compris *Bacillus subtilis* qui fait pourrir le riz cuit, le pain, etc., *Staphylococcus aureus* qui est une bactérie patho-
15 gène provoquant des intoxications alimentaires, *Escherichia coli*, et d'autres bactéries Gram-positives appartenant aux genres *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Glostridium*, *Straptococcus*, etc., et des bactéries Gram-négatives appartenant aux genres *Escherichia*, *Pseudomonas*, etc.

On peut utiliser la moricine comme agent antibactérien, tel quel
20 ou après l'avoir formulée en comprimés, en poudre, en poudre mouillable, en émulsion, en capsules ou autres formulations semblables, en utilisant un véhicule solide ou liquide classique, un dispersant pour émulsion, etc. Comme véhicule utilisable, on peut citer l'eau, la gélatine, l'amidon, le stéarate de magnésium, le lactose, la gomme arabique, l'huile végétale,
25 etc.

L'agent antibactérien mentionné plus haut englobe un agent conservateur pour aliments, un agent antibactérien à usage médical, un agent conservateur pour matériaux de construction et/ou peintures, un agent antibactérien à usage horticole, un agent conservateur destiné à des
30 aliments pour bétail, un agent conservateur destiné à des aliments pour poissons, etc. Cet agent antibactérien peut donc être utilisé dans des domaines très divers.

Quand on ajoute à un aliment de la moricine en tant qu'agent conservateur, on peut par exemple la mélanger dans l'aliment ou en enro-
35 ber l'aliment. Dans ce cas, la quantité de moricine ajoutée vaut 2 mg ou



plus par kg d'aliment, et de préférence, de 5 à 50 mg/kg.

Comme exemples d'aliments auxquels on peut ajouter de la moricine, on peut citer les produits marins traités, comme de la pâte de poisson bouilli, les produits animaux traités, tels que jambons et saucisses, les
5 boissons, comme les boissons non alcoolisées et les jus de fruits, et les pâtisseries, comme les gâteaux, les puddings et les petits pains fourrés à la pâte de soja.

L'agent antibactérien comprenant de la moricine comme ingrédient actif peut être mélangé de façon appropriée et utilisé en combinaison
10 avec d'autres bactéricides, produits pharmaceutiques, antiseptiques, adjuvants pour aliments ou composés semblables.

La moricine présente effectivement une activité antibactérienne contre diverses bactéries Gram-négatives ou Gram-positives, y compris
15 *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus* qui sont des bactéries pathogènes provoquant des intoxications alimentaires. Par conséquent, la moricine est utilisable comme agent conservateur pour aliments et comme agent antibactérien destiné à des applications médicales.

On va maintenant décrire la présente invention de façon plus détaillée dans les exemples suivants, qui relatent l'isolement de la moricine à partir de l'hémolymphe de vers à soie chez lesquels on a provoqué
20 l'apparition d'une activité antibactérienne, puis la production de moricine selon des techniques de génie génétique, et dans des exemples de tests d'activité antibactérienne. Il ne faut pas considérer que ces exemples limitent le cadre de la présente invention.

25

Exemple 1

A) Isolement de la moricine à partir de l'hémolymphe de vers à soie où l'on a provoqué l'apparition d'une activité antibactérienne.

30

1) On injecte une suspension d'*Escherichia coli* HB101 (ATCC-33694) dans du sérum physiologique (4.10^8 cellules/ml), dans la cavité corporelle de 700 larves de vers à soie au cinquième stade de croissance (variété : Bombyx mori var. Tokai x Asahi; fournies par l'Institut National de Sériculture et d'Entomologie, Ministère de l'Agriculture, des Forêts
35 et des Pêcheries du Japon) à raison de 0,005 ml/larve, pour y provoquer



l'apparition d'une activité antibactérienne. Vingt heures après l'injection, on incise les pattes des larves de vers à soie et on en recueille l'hémolymph. Immédiatement après cette collecte, on chauffe l'hémolymph dans un bain d'eau à 100°C pendant 5 minutes, puis on la soumet à une centrifugation.

2) A 200 ml du surnageant résultant, on ajoute du sulfate d'ammonium en une quantité correspondant à 15% de la quantité nécessaire pour la saturation, et il se forme alors un précipité que l'on sépare par centrifugation. On ajoute encore du sulfate d'ammonium au surnageant résultant, en une quantité correspondant à 75% de la quantité nécessaire pour la saturation. On sépare par centrifugation le précipité formé et on le recueille, puis on le dissout dans 40 ml d'eau distillée.

3) On verse la solution obtenue dans une colonne de Sephadex G-50 (5 x 100 cm) équilibrée avec une solution d'acétate d'ammonium 50 mM (pH 5,0), pour effectuer ainsi une filtration sur gel, et l'on récupère alors les fractions de protéines à faible masse moléculaire.

4) On verse les fractions de protéines à faible masse moléculaire dans une colonne CM Sepharose FF (2,5 x 4,4 cm), équilibrée avec une solution d'acétate d'ammonium 50 mM (pH 5,0). On élue les fractions adsorbées en versant dans cette colonne, l'un après l'autre et à raison de 50 ml chacun, des mélanges d'une solution d'acétate d'ammonium 50 mM (pH 5,0) et d'une solution d'acétate d'ammonium 0,8 mM (pH 7,0) en des rapports de 9,5/0,5, 9/1, 8/2, 7/3, 6/4, 5/5, 4/6 et 3/7 en volume. On recueille l'éluat par fractions de 50 ml, en fonction de la concentration de sel. C'est la fraction que l'on élue avec le mélange en un rapport de 4/6 qui présente la plus forte activité antibactérienne.

5) On soumet 10 ml de la fraction élue avec le mélange en un rapport de 4/6 à une HPLC à polarité de phases inversée (colonne : Capcell Pak C8 SG300 10 x 250 mm). On élue les fractions adsorbées avec un mélange à gradient de densité d'eau et d'acétonitrile, contenant 0,1% d'acide trifluoroacétique. On recueille l'éluat et on rassemble les fractions présentant la plus forte activité antibactérienne.

6) On soumet à nouveau les fractions rassemblées à une HPLC à polarité de phases inversée (colonne : Capcell Pack C8 SG300, 4,6 x 250 mm) pour les purifier davantage. On élue les fractions adsor-



bées avec un mélange d'eau et d'acétonitrile à gradient de densité, contenant 0,1% d'acide trifluoroacétique. On recueille l'éluat et on rassemble les fractions présentant la plus forte activité antibactérienne. On en soumet une partie à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS Tricine (appelé ci-après "Tricine SDS-PAGE") et après le déroulement de cette opération, on colore le gel avec du Bleu brillant de Coomassie R-250 (BRL). On obtient une seule bande colorée.

7) En suivant les protocoles opératoires indiqués ci-dessus, on obtient 150 µg de moricine à partir de 200 ml du surnageant de centrifugation de l'hémolymph de vers à soie.

Au cours des opérations d'isolement de la moricine, on mesure l'activité antibactérienne des diverses fractions en utilisant comme indicateur l'apparition, sur une plaque de gélose, d'une zone d'inhibition de la prolifération [Nature, 292:246 (1981)] de la souche bactérienne d'essai ATCC 6538P de *Staphylococcus aureus*, sous-espèce *aureus*.

On mesure la quantité de protéines selon une variante améliorée de la méthode de Lowry [Methods Enzymol. 91:95 (1983)], et on réalise la Tricine-SDS-PAGE selon le protocole décrit dans Anal. Biochem. 166:368 (1987).

20

B) Analyse structurale

1) Composition en acides aminés

On soumet la moricine ainsi obtenue à une hydrolyse dans une solution 6N d'HCl, contenant 0,1% de phénol, sous pression réduite, à 110°C et pendant 24 heures, et on analyse ensuite le mélange ainsi obtenu dans un appareil d'analyse d'acides aminés, modèle 835 d'Hitachi. Les résultats obtenus sont présentés ci-dessous.

25



	Acide aminé	Nombre de moles par mole de moricine
	Lys	8,8
	Ala	5,9
5	Ile	4,8
	Asp+Asn	4,0
	Gly	3,1
	Val	3,2
	Arg	1,7
10	Leu	2,1
	Phe	2,3
	Pro	1,9
	Thr	1,9
	His	1,4
15	Ser	1,0

2) Masse moléculaire

On trouve que la masse moléculaire de la moricine obtenue vaut $4543,1 \pm 0,6$ Da, résultat d'une analyse réalisée à l'aide d'un spectromètre de masse (Modèle API-III de Perkin Elmer Sciex).

3) Séquence N-terminale d'acides aminés

On détermine la séquence N-terminale d'acides aminés de la moricine selon le procédé de dégradation d'Edman, à l'aide d'un appareil de séquençage de protéines (Modèle 473A d'(Applied Biosystems). Comme résultat, on obtient la séquence d'acides aminés appelée "Séquence n°2" dans l'annexe intitulé "Séquences de peptides et d'ADN".

4) Séquences d'acides aminés des fragments peptidiques issus d'une digestion par une endoprotéinase.

On fait digérer la moricine par l'endoprotéinase Asp-N (Takara Shuzo) et l'on isole les fragments peptidiques résultants par HPLC à polarité de phases inversée. On détermine la séquence d'acides aminés de chacun des fragments ainsi obtenus, selon le procédé de dégradation d'Edman. Comme résultat, on obtient les séquences d'acides aminés appelées "Séquence n°3" et "Séquence n°4" de l'annexe intitulée "Séquences de peptides et d'ADN".



- 5) A partir des résultats obtenus lors de la détermination de la composition en acides aminés, de la masse et de la séquence d'acides aminés, on conclut que la moricine obtenue est un peptide présentant la séquence d'acides aminés appelée "Séquence n°1" de l'annexe intitulée "Séquences de peptides et d'ADN".

Exemple d'essai 1

Premier essai de l'activité antibactérienne

- Afin d'étudier l'activité antibactérienne de la moricine obtenue selon l'exemple 1 contre diverses bactéries, on détermine la concentration inhibitrice minimale (C.I.M.) de moricine selon le procédé décrit dans Eur. J. Biochem., 187:381-386 (1990). Les résultats obtenus sont présentés plus loin dans le Tableau 1.

Bactéries soumises à l'essai :

- Escherichia coli* JM109 (Takara Shuzo)
Staphylococcus aureus, sous-espèce *aureus*, ATCC 6538P
Bacillus cereus IFO3457

Milieus utilisés pour l'essai :

- Quand on utilise comme bactérie *E. coli* ou *Staphylococcus aureus*, sous-espèce *aureus*, on utilise un milieu d'infusion de cœur-cerveau (milieu BHI de Difco). Quand on utilise *Bacillus cereus* comme bactérie, on utilise un milieu de bouillon nutritif (milieu NB de Difco).

Protocole pour l'essai d'activité antibactérienne.

- Au milieu contenant en suspension la bactérie soumis à l'essai, en une concentration de $4 \cdot 10^4$ cellules/ml, on ajoute un volume égal du même milieu contenant de la moricine, à diverses concentrations, et l'on fait incuber le tout à 30°C pendant 20 heures. Après cette incubation, on y ajoute un volume égal de formaline à 6%, ce qui donne une solution deux fois plus diluée. On détermine ensuite le degré de prolifération des cellules, en mesurant l'absorbance à 950 nm. En guise de témoin, on utilise de la cécropine B1 [Comp. Biochem. Physiol. 95B:551 (1990)], qui est un peptide antibactérien connu, obtenu à partir de vers à soie.



Tableau 1

5	Bactérie	Milieu	C.I.M. (mg/ml)	
			Moricine	Cécropine B1
	<i>Escherichia coli</i> JM109	BHI	8	< 1
	<i>Staphylococcus aureus</i> , sous- espèce <i>aureus</i> , ATCC 6538P	BHI	2	>16
10	<i>Bacillus cereus</i> IF03457	NB	8	>16

Exemple d'essai 2

Essai d'activité antibactérienne n°2

15 On étudie l'activité antibactérienne de la moricine obtenue selon l'exemple 1 contre diverses bactéries, selon le procédé décrit dans Nature, 292:246 (1981). Les résultats obtenus sont présentés plus loin dans le Tableau 2.

20 Bactéries soumises à l'essai :

Escherichia coli JM109 (Takara Shuzo)

Pseudomonas fluorescens IAM1179

Bacillus subtilis IAM1107

Bacillus megaterium IAM1030

25 *Bacillus cereus* IFO3457

Staphylococcus aureus ATCC6538P

Staphylococcus aureus IFO3083

Staphylococcus epidermidis IFO12993

Staphylococcus xylosus IAM1312

30 *Pseudomonas aeruginosa* IAM1514

Streptococcus pyogenes ATCC2147

Milieux utilisés pour l'essai :

35 On utilise du milieu NB en plaque, contenant 0,8% d'agarose. Eventuellement, on y ajoute du chlorure de sodium en une concentration



de 150 mM. Quand on utilise *Streptococcus pyogenes* comme bactérie, on utilise du milieu BHI en plaque contenant 0,8% d'agarose.

Protocole d'essai d'activité antibactérienne

- 5 On prépare une solution de moricine à 50 μ M, et l'on ajoute 2 μ l de cette solution dans des cuvettes pratiquées dans un milieu en plaque où l'on a inoculé la bactérie soumise à l'essai. On fait incuber la plaque de milieu à 30°C jusqu'au lendemain, et l'on mesure les diamètres des zones d'inhibition de la prolifération qui sont apparues. On utilise de la cécropine B1 en guise de témoin. A ce propos, le diamètre des cuvettes vaut 2,0 mm. Lorsqu'il est indiqué, dans le tableau 2, que le diamètre de la zone d'inhibition vaut 2,0 mm, cela signifie qu'il n'y a pas de zone d'inhibition.
- 10



Tableau 2

5	Bactérie	Addition de chlorure de sodium	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)	
			Moricine	Cécropine B1
10	<i>Escherichia coli</i> JM109	—	8,7	10,1
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> IAM1179	—	8,6	8,9
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IAM1514	—	7,0	7,9
	<i>Bacillus subtilis</i> IAM1107	—	9,7	7,8
	<i>Bacillus megaterium</i> IAM1030	—	11,3	10,9
	<i>Bacillus cereus</i> IF03457	—	8,0	2,0
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538P	—	10,0	6,9
	" " "	+	11,8	2,3
	<i>Staphylococcus aureus</i> IF03083	—	9,0	2,0
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> IF012993	—	10,7	9,0
20	<i>Staphylococcus xylosus</i> IAM1312	—	9,6	2,0
	<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC21547	—	11,0	2,0

25

Comme le montrent les Tableaux 1 et 2, on constate que la moricine présente une forte activité antibactérienne contre diverses bactéries Gram-négatives ou Gram-positives, y compris *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus* qui sont des bactéries pathogènes provoquant des intoxications alimentaires.

30

Exemple 2

Production de moricine par des techniques de génie génétique.

35

On réalise la production de moricine par des techniques de génie génétique, selon les procédés suivants. En résumé, on construit un ADN



contenant un gène de moricine, par synthèse chimique. On prépare ensuite le plasmide pUCMOR1, en insérant l'ADN mentionné ci-dessus dans un plasmide. Pour amplifier le plasmide pUCMOR1, on transforme *E. coli* à l'aide de ce plasmide. Puis on prépare le plasmide pXAMOR1, qui servira à l'expression de la moricine, par sous-clonage de l'insert d'ADN de pUCMOR1. On transforme ensuite *E. coli* avec ce dernier plasmide. En utilisant le microorganisme de recombinaison qui en résulte, on obtient une protéine de fusion comportant la moricine. On purifie grossièrement cette protéine de fusion, puis on la traite avec du bromure de cyanogène pour obtenir de la moricine grossièrement purifiée.

On va maintenant décrire de façon plus détaillée chacune des étapes de procédé indiquées ci-dessus.

A) Construction, par synthèse chimique, d'un ADN contenant un gène de moricine.

1) Détermination de la séquence de bases

On détermine la séquence de l'ADN à construire, c'est-à-dire l'ADN contenant un gène de moricine, avec les codons qui sont fréquemment utilisés chez *E. Coli* [Ikemura, T., J. Mol. Biol., 151:389-409 (1987)]. La structure de cet ADN est la suivante : en aval du site de reconnaissance d'*EcoRI*, on trouve, dans l'ordre indiqué, un codon correspondant à la méthionine (ATG), en vue de l'opération de coupure par le bromure de cyanogène, un gène de moricine, deux codons de terminaison (TAA et TAG) et le site de reconnaissance de *SalI*. La séquence de bases du gène de moricine ainsi déterminée est représentée par la séquence n°5 de l'annexe "Séquence de peptides et d'ADN".

2) Synthèse chimique d'oligonucléotides

On divise l'ADN contenant le gène de moricine en huit oligonucléotides, appelé "mosy-1", "mosy-2", ... "mosy-8", et l'on synthétise chimiquement chacun de ces oligonucléotides. On réalise la synthèse des ces nucléotides à l'aide d'un appareil de synthèse d'ADN (ABI, Modèle 392, Applied Biosystems), selon la méthode au phosphoramidite.

Les séquences de bases des oligonucléotides mosy-1, mosy-2, ... mosy-8 sont les suivantes :



mosy1 AATTCATGGCTAAAATCCCGATTAAGGCAATTAAA
 mosy2 ACTGTGGGCAAAGCTGTTGGTAAAGGTCTGCGTG
 mosy3 CTATCAACATCGCTTCTACCGCTAACGACGTATTCAA
 5 mosy4 CTTCTGAAACCGAAGAAACGTAAACACTAATAG
 mosy5 CACAGTTTTAATTGCCTTAATCGGGATTTTAGCCATG
 mosy6 GTTGATAGCACGCAGACCTTACCAACAGCTTTGCC
 mosy7 CAGGAAGTTGAATACGTCGTTAGCGGTAGAAGCGAT
 10 mosy8 TCGACTATTAGTGTTTACGTTTCTTCGGTTT

3) Purification des oligonucléotides synthétiques

On purifie ces oligonucléotides synthétiques en utilisant la
 trousse QIAGEN Plasmid Kit (Funakoshi). Tout d'abord, on dissout une
 15 portion d'oligonucléotides, synthétisés selon les indications du paragra-
 phe (2) ci-dessus, dans une solution de MOPS (50 mM de MOPS (pH 7,0),
 0,1 M de NaCl) afin d'obtenir une solution d'oligonucléotides à 20 µg/ml.
 Dans une petite colonne de purification (QIAGEN-tip 20) équilibrée avec
 2 ml d'une solution d'équilibrage (50 mM de MOPS (pH 7,0), 0,1 M de
 20 NaCl, 0,15 % de Triton X-100), on ajoute 1 ml de la solution d'oligonu-
 cléotides mentionnée ci-dessus, pour que les oligonucléotides s'y adsor-
 bent. Puis on lave la petite colonne avec 4 ml de solution de MOPS. On
 effectue ensuite l'élution, la précipitation et le lavage des oligonucléoti-
 des selon le protocole indiqué par le fabricant de la trousse. On dissout
 25 chacun des oligonucléotides ainsi obtenus (6 à 13 µg) dans 15 µl de solu-
 tion TE (10 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM d'EDTA).

4) Phosphorylation des oligonucléotides

On opère la phosphorylation des extrémités 5'-terminales des six
 30 oligonucléotides mosy-2 à mosy-7, à l'aide d'ATP et de polynucléotide
 kinase de T4. Pour chaque oligonucléotide, on effectue cette réaction
 dans un tube distinct. Les conditions de cette réaction sont les suivantes.
 On mélange 3 µg d'un oligonucléotide, dissous dans de la solution TE,
 2 µl d'un tampon pour kinase 10x (500 mM de Tris-HCl (pH 7,6), 100 mM
 35 de MgCl₂, 50 mM de DTT, 1 mM de spermidine-HCl, 1 mM d'EDTA; Nip-



pon Gene Co., Ltd.), 2 µl d'ATP 10 mM et 20 U de polynucléotide kinase de T4 (Nippon Gene), et l'on y ajoute de l'eau distillée pour compléter le volume de la solution à 20 µl. On fait réagir ce mélange à 37°C pendant 2 heures, puis on le chauffe à 90°C pendant 3 minutes pour mettre fin à la réaction.

5) Construction d'un ADN contenant le gène de moricine

a) Hybridation des oligonucléotides

On rassemble dans un seul tube les mélanges réactionnels de phosphorylation de chacun des oligonucléotides de mosy-2 à mosy-7, ce qui donne un mélange de 120 µl auquel on ajoute 3 µg de mosy-1 et 3 µg de mosy-8. On ajoute encore au mélange obtenu 20 µl de tampon pour ligase 10x (500 mM de Tris-HCl (pH 7,9), 100 mM de MgCl₂, 200 mM de DTT, 10 mM d'ATP; Nippon Gene), puis on y ajoute de l'eau distillée pour obtenir une solution de 197 µl. On chauffe cette solution à 90°C pendant 5 minutes, puis on la refroidit immédiatement sur de la glace et on la chauffe à 75°C pendant 10 minutes dans un bloc chauffant (Dry Thermo Unit, modèle AL-10; Taitec Co., Ltd.). On enlève ensuite le bloc et on laisse la solution reposer pendant 5 heures.

b) Ligature des oligonucléotides

Aux 197 µl du mélange réactionnel ci-dessus, on ajoute 1800 unités d'ADN ligase de T4 (Nippon Gene) et on fait réagir le tout à 16°C pendant 14 heures.

c) Purification de l'ADN

A une fraction de 30 µl du mélange réactionnel ci-dessus, on ajoute 3 µl de solution BPB (0,1% de BPB, 30% de glycérol) et on soumet le tout à une électrophorèse sur gel d'agarose à 3%, et l'on découpe dans le gel la bande correspondant à un ADN de 140 pb de long. On récupère l'ADN présent dans cette bande de gel en effectuant des opérations de congélation-décongélation et de précipitation par de l'éthanol. On dissout l'ADN obtenu (800 ng) dans 9 µl de solution tampon pour kinase 1x.

d) Phosphorylation de l'ADN contenant le gène de moricine

On ajoute, à 8 µl de la solution d'ADN obtenue ci-dessus, 1 µl d'ATP 10 mM et 10 unités de polynucléotide kinase de T4, et l'on fait réagir le tout à 37°C pendant 2 heures, puis on chauffe la solution à 90°C pen-



5 dant 3 minutes pour mettre fin à la réaction.

B) Préparation d'un ADN recombiné, le plasmide pUCMORI

5 Le plasmide pUCMORI porte, inséré en son sein, l'ADN contenant le gène de moricine. On prépare ce plasmide de la façon décrite ci-dessous.

10 On ajoute de l'eau distillée, en la quantité nécessaire pour obtenir une solution de 40 µl, à un mélange constitué de 4 µg de plasmide pUC119 (Takara Shuzo), 4 µl de tampon H 10x (500 mM de Tris-HCl (pH 7,5), 100 mM de MgCl₂, 10mM de DTT, 1000 mM de NaCl; Takara Shuzo) et de 20 unités de chacune des enzymes de restriction *EcoRI* (GIBCO BRL) et *SaII* (Takara Shuzo). On soumet cette solution à une opération de digestion à 37°C pendant 20 heures, puis on chauffe la solution à 65°C pendant 15 minutes pour mettre fin à la réaction. On mélange 2 µl du
15 mélange réactionnel ainsi obtenu, ce qui correspond à 200 ng du plasmide, 10 µl de la solution d'ADN contenant le gène de moricine que l'on a préparé selon le paragraphe A.5) ci-dessus, 2 µl de tampon pour ligase 10x, 2 µl d'une solution de sérumalbumine bovine à 2µg/ml, et 1200 unités d'ADN ligase de T4, puis on y ajoute de l'eau distillée pour compléter le
20 volume de la solution à 20 µl. On soumet ce mélange à une réaction de ligature à 16°C pendant 6 heures.

On mélange 20 µl du mélange réactionnel de ligature obtenu ci-dessus avec 100 µl d'une suspension de cellules compétentes (*Escherichia coli* JM109, Nippon Gene), puis on transforme les cellules en maintenant le mélange sur de la glace pendant 30 minutes, puis à 37°C pendant 2
25 minutes et enfin sur de la glace pendant 5 minutes. On ajoute ensuite à ce mélange 400 µl de bouillon HCB (Nippon Gene) et l'on fait incuber le tout à 37°C pendant 1 heure sous agitation. On étale la culture résultante, en la répartissant uniformément, sur quatre plaques de milieu YT 2x (1,6% de tryptone, 1% d'extrait de levure, 0,5% de NaCl) gélosé et contenant
30 50 µg/ml d'ampicilline, 0,1 mM d'IPTG et 40 µg/ml d'X-gal, et l'on fait incuber le tout à 37°C pendant 20 heures. On obtient ainsi environ 300 souches résistant à l'ampicilline.

35 Parmi ces souches résistant à l'ampicilline, on sélectionne 20 souches formant des colonies bleu clair, et on les fait incuber dans 3 ml de



milieu liquide LB contenant 50 µg/ml d'ampicilline, à 37°C pendant 10 heures. On soumet le milieu de culture à une centrifugation, pour récolter les cellules. On purifie ensuite l'ADN plasmidique en utilisant la trousse QIAGEN Plasmid Mini Kit (Funakoshi), et on le dissout dans 20 µl de solution TE.

On ajoute de l'eau distillée, en la quantité nécessaire pour obtenir une solution de 10 µl, à un mélange constitué de 2 µl de la solution de plasmide obtenue ci-dessus, 1 µl de tampon H 10x, 3 unités d'*EcoRI* et 3 unités de *SaII*, et l'on fait réagir ce mélange à 37°C pendant 90 minutes. Puis on ajoute à ce mélange réactionnel 1 µl de solution BPB, et on le soumet à une électrophorèse sur gel d'agarose à 4%, pour obtenir une confirmation de la longueur de l'insert d'ADN découpé par les enzymes de restriction. On observe des fragments de longueurs variées, allant d'environ 120 à 140 pb.

Pour les 14 plasmides dans lesquels est inséré un ADN d'environ 140 pb, on détermine la séquence de bases de chaque insert d'ADN. On effectue cette opération à l'aide de la trousse de séquençage Taq Dye Primer Cycle (ABI), du système de PCR GeneAmp 9600 (Perkin Elmer Cetus) et d'un appareil de séquençage d'ADN ABI, modèle 373A. Il y a 4 plasmides dans lesquels a été inséré l'ADN contenant le gène de moricine. On appelle "pUCMORI" l'un de ses plasmides.

C) Préparation d'un ADN recombiné pour l'expression de la moricine (plasmide pXAMORI)

On obtient le plasmide pXAMOR1 en réalisant le sous-clonage de l'ADN contenant le gène de moricine, inséré dans le plasmide pUCMOR1, entre le site d'*EcoRI* et le site de *SaII* du plasmide pXal. Le plasmide pXAMOR1, sous le contrôle du promoteur/opérateur *lac*, exprime une protéine de fusion qui comprend la β-galactosidase, un segment du collagène et la moricine. On décrit ci-dessous de façon détaillée la préparation du plasmide pXAMOR1.

On ajoute de l'eau distillée, en la quantité nécessaire pour obtenir une solution de 100 µl, à un mélange constitué de 5 µg de plasmide pXal (Boehringer Mannheim), 10 µl de tampon H 10x, 20 unités d'*EcoRI* et 20 unités de *SaII*. On soumet ce mélange à une réaction de digestion à



37°C pendant 20 heures, puis on le chauffe à 65°C pendant 15 minutes pour mettre fin à cette réaction. On obtient ainsi des fragments du plasmide pXa1.

5 D'autre part, on fait digérer le plasmide pUCMOR1 par *EcoRI* et *SaII*, pour découper dans ce plasmide l'ADN inséré, que l'on purifie ensuite par électrophorèse sur gel d'agarose. Les conditions de réaction sont indiquées ci-dessous.

10 A un mélange constitué de 10 µg de plasmide pUCMOR1, 5 µl de tampon H 10x et 20 unités de chacune des enzymes de restriction *EcoRI* et *SaII*, on ajoute de l'eau distillée pour compléter le volume de la solution à 50 µl. On soumet cette solution à une réaction de digestion à 37°C pendant 20 heures. On ajoute au mélange réactionnel obtenu 3 µl d'une solution de BPB, puis on soumet le tout à une électrophorèse sur gel d'agarose à 3%, et l'on découpe dans le gel une bande correspondant à un ADN long d'environ 15 140 pb. On récupère ensuite l'ADN présent dans cette bande de gel en effectuant des opérations de congélation-décongélation et de précipitation dans l'éthanol. On dissout les 60 ng d'ADN ainsi obtenus dans 18 µl d'eau distillée.

20 On mélange ensuite 20 ng de l'insert d'ADN purifié, 1 µl (50 ng) de fragments du plasmide pXa1, 1 µl de tampon pour ligase 10x, 1 µl de solution de SAB (sérumalbumine bovine) à 2 µg/ml, et 600 unités d'ADN ligase de T4, et l'on y ajoute de l'eau distillée en une quantité suffisante pour obtenir une solution dont le volume vaut 10 µl. On soumet cette solution à une réaction de ligature à 16°C pendant 5 heures.

25 On mélange ensuite la solution réactionnelle de ligature indiquée ci-dessus avec 100 µl d'une suspension de cellules compétentes (*Escherichia coli* JM109, Nippon Gene) et l'on transforme ensuite ces cellules en maintenant le mélange sur de la glace pendant 30 minutes, puis à 37°C pendant 2 minutes et à nouveau sur de la glace pendant 5 minutes. 30 On étale le mélange réactionnel sur deux plaques de milieu YT 2x gélosé, contenant 50 µg/ml d'ampicilline, et l'on fait incuber ces plaques à 37°C pendant 20 heures, ce qui permet d'obtenir environ 1000 souches résistant à l'ampicilline.

35 Parmi ces souches résistant à l'ampicilline, on sélectionne 10 souches et on les fait incuber dans 3 ml de milieu liquide LB contenant



50 µg/ml d'ampicilline, à 37°C pendant 10 heures. On soumet le milieu de culture à une centrifugation, pour récolter les cellules, puis on purifie les plasmides, en utilisant la trousse QIAGEN Plasmid Mini Kit, et on les dissout dans 20 µl de solution TE.

5 A un mélange constitué de 2 µl de la solution de plasmides obtenue ci-dessus, 1 µl de tampon H 10x, 3 unités d'*EcoRI* et 3 unités de *SaII*, on ajoute de l'eau distillée pour compléter à 10 µl le volume de la solution, et l'on fait réagir ce mélange à 37°C pendant 90 minutes. On ajoute à ce mélange réactionnel 1 µl de solution de BPB, et on soumet le mélange à
10 une électrophorèse sur gel d'agarose à 4%, pour confirmer la longueur de l'insert d'ADN découpé par les enzymes de restriction. On obtient en guise de résultat la confirmation que chaque plasmide porte bien un insert d'ADN d'environ 140 pb de long. On appelle l'un de ces plasmides "pXAMOR1". La souche *E. coli* de recombinaison qui héberge
15 pXAMOR1 a été appelée "*E. coli* JM109 (pXAMOR1)", et elle a été déposée à l'Institut National des Sciences Biologiques et de la Technologie Humaine, Agence des Sciences industrielles et de la Technologie, avec le numéro d'accès FERM BP-5099.

20 D) Production d'une protéine de fusion de la moricine par le microorganisme de recombinaison.

1) Confirmation de la production d'une protéine de fusion

25 Dans 2 ml de milieu liquide LB, on inocule une colonie de la souche *E. Coli* de recombinaison qui héberge le plasmide pXAMOR1, c'est-à-dire la souche *E. coli* JM109 (pXAMOR1), et on l'y fait incuber à 37°C pendant 2 heures. On y ajoute ensuite 10 µl d'IPTG 100 mM, afin de provoquer l'expression d'une protéine de fusion, et l'on fait à nouveau incuber cette souche d'*E. coli* à 37°C pendant 2 heures. On soumet 0,5 ml de la solution de culture à une centrifugation, pour récolter les cellules, et l'on
30 met le culot de cellules en suspension dans 100 µl de solution tampon (62.5 mM de Tris-HCl (pH 6,8), 10% de glycérol, 2% de SDS, 5% de 2-mercaptoéthanol, 0,0025% de BPB) et on chauffe le tout à 100°C pendant 5 minutes. On soumet 3 µl de cette suspension à une électrophorèse SDS-PAGE. D'autre part, on soumet également à une électrophorèse SDS-PAGE,
35 en guise de témoin, une solution de culture d'*E. coli* de recombinaison.



naison que l'on a fait incuber sans y ajouter de l'IPTG.

La masse moléculaire attendue pour la protéine de fusion comprenant la β -galactosidase, un segment de collagène et la moricine vaut 127,5 kDa. Ce n'est que lorsque l'*E. coli* de recombinaison a été cultivée en présence d'IPTG que l'on observe une bande à 127,5 kDa environ. On confirme ainsi l'expression de la protéine de fusion.

2) Purification grossière de la protéine de fusion

On fait incuber l'*E. coli* de recombinaison dans 20 ml de milieu liquide YT 2x contenant de l'ampicilline, à 37°C pendant 14 heures. Puis on ajoute, dans flacons contenant chacun 300 ml de milieu liquide YT 2x contenant 50 μ g/ml d'ampicilline, la solution de préculture mentionnée ci-dessus, à raison de 10 ml par flacon, et on fait incuber le tout à 37°C pendant 2 heures. Puis on ajoute dans chaque flacon 1,5 ml d'IPTG 100 mM, et on fait incuber les *E. coli* pendant 2 heures supplémentaires. On soumet les milieux de culture à une centrifugation, pour récolter les cellules. On obtient ainsi 3,7 g de cellules.

On met ces cellules en suspension dans 35 ml d'une solution contenant 20 mM de Tris-HCl (pH 7,4), 200 mM de NaCl, 1 mM d'EDTA (pH 8,0 et 10 mM de 2-mercaptoéthanol. On soumet cette suspension à des opérations de congélation-décongélation et de sonication (à l'aide d'un appareil Sonifier Cell Disruptor W200P, BRANSON) pour rompre les cellules. On soumet ensuite à une centrifugation la suspension de cellules rompues ainsi obtenues, et on remet le culot en suspension dans 35 ml d'une solution contenant 0,5% de Triton X-100 et 10 mM d'EDTA (pH 8,0). On soumet cette suspension à une nouvelle opération de centrifugation à l'issue de laquelle on jette le surnageant, et c'est ainsi que l'on obtient 9 mg de protéine. On soumet cette matière, qui est une protéine de fusion grossièrement purifiée, au traitement par le bromure de cyanogène décrit ci-dessous.

3) Traitement par le bromure de cyanogène

On ajoute, à 1 mg de protéine de fusion grossièrement purifiée, obtenue selon le procédé indiqué ci-dessus, 200 μ l d'acide formique à 70% et 10 μ l d'une solution à 100 mg/ml de bromure de cyanogène dissous dans de l'acétonitrile, et l'on fait réagir le tout à la température ambiante pendant 24 heures. On évapore ensuite la solution réactionnelle à sec sous



pression réduite. On soumet le résidu, considéré comme étant de la moricine grossièrement purifiée, à l'essai d'activité antibactérienne décrit ci-dessous.

5

Exemple d'essai 3

Essai d'activité antibactérienne n° 3

Selon le procédé décrit dans Nature, 292:249 (1981), on étudie l'activité antibactérienne de la moricine grossièrement purifiée contre diverses bactéries. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 3.

10

Bactéries utilisées pour l'essai :

Staphylococcus aureus ATCC6538P

Streptococcus pyogenes ATCC21547

Escherichia coli JM109 (Takara Shuzo)

15

Pseudomonas fluorescens IAM1179

Milieux utilisés pour l'essai :

20

On utilise en général des plaques de milieu NB contenant 0,8% d'agarose, mais quand on utilise *Staphylococcus aureus* comme bactérie soumise à l'essai, on ajoute du chlorure de sodium en une concentration de 150 mM. Quand on utilise *Streptococcus pyogenes* comme bactérie, on utilise une plaque de milieu BHI contenant 0,8% d'agarose.

Protocole suivi pour cette essai d'activité antibactérienne

25

On ajoute de l'eau distillée à la moricine grossièrement purifiée, de façon à préparer une suspension de protéine présentant une concentration d'environ 10 µg/µl. On dépose 2 µl de cette suspension dans chacune des cuvettes pratiquées sur une plaque de milieu dans laquelle on a inoculé la bactérie soumise à l'essai. Puis on fait incuber la plaque à 30°C jusqu'au lendemain et l'on mesure le diamètre de la zone d'inhibition de la prolifération qui est apparue.

30

A titre de témoin, on prépare les substances suivantes :

Témoin n°1

35

C'est une protéine de fusion, comportant la β-galactosidase et un segment de collagène, qui a été produite par la souche E. coli de recombi-



naison hébergeant pXal, et qui n'a pas subi de traitement par le bromure de cyanogène.

Témoin n°2

- 5 C'est la protéine de fusion produite par la souche *E. Coli* de recombinaison hébergeant pXal, et traitée par le bromure de cyanogène.

Témoin n°3

- 10 C'est la protéine de fusion comprenant la β -galactosidase, un segment de collagène et la moricine, qui a été produite par la souche *E. coli* de recombinaison hébergeant pXAMORI et qui n'a pas subi de traitement par le bromure de cyanogène.

Lorsque l'on n'effectue pas le traitement par le bromure de cyanogène, on ajoute 10 μ l d'acétonitrile au lieu des 10 μ l de la solution de bromure de cyanogène, et l'on effectue un traitement similaire.



TABLEAU 3

Diamètre de la zone d'inhibition (mm)					
	Témoin	Témoin	Témoin	Moricine	
	n°1	n°2	n°3	grossière- ment purifiée	
5					
10					
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538P	2	2	2	7,0
15					
	<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC21547	2	2	2	5,3
20					
	<i>Escherichia coli</i> JM109	2	2	2	5,9
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> IAM1179	2	2	2	3,9
25					

30 D'après les résultats présentés dans le tableau 3, on constate que, de même que de la moricine naturelle isolée à partir de l'hémolymphe de vers à soie, une moricine produite par une souche *E. coli* de recombinaison, selon des techniques de génie génétique, présente une activité antibactérienne contre des bactéries Gram-positives ou Gram-négatives.

35 En outre, la moricine ne présente pas d'activité antibactérienne



lorsqu'elle se trouve sous la forme d'une protéine de fusion. La moricine ne présente une activité antibactérienne que lorsqu'elle est séparée de la protéine de fusion par traitement avec du bromure de cyanogène.



ANNEXE

Séquences de peptides et d'ADN

Séquence n° 1 :

5

Peptide linéaire comportant 42 résidus d'acide aminé

Ala Lys Ile Pro Ile Lys Ala Ile Lys Thr Val Gly Lys Ala Val Gly
 1 5 10 15
 10 Lys Gly Leu Arg Ala Ile Asn Ile Ala Ser Thr Ala Asn Asp Val Phe
 20 25 30
 Asn Phe Leu Lys Pro Lys Lys Arg Lys His
 15 35 40

Séquence n° 2 :

Peptide linéaire comportant 33 résidus d'acide aminé

20

Ala Lys Ile Pro Ile Lys Ala Ile Lys Thr Val Gly Lys Ala Val Gly
 1 5 10 15
 Lys Gly Leu Arg Ala Ile Asn Ile Ala Ser Thr Ala Asn Asp Val Phe
 20 25 30
 25 Asn



Séquence n° 3 :**Peptide linéaire comportant 29 résidus d'acide aminé**

Ala Lys Ile Pro Ile Lys Ala Ile Lys Thr Val Gly Lys Ala Val Gly
 1 5 10 15
 5 Lys Gly Leu Arg Ala Ile Asn Ile Ala Ser Thr Ala Asn
 20 25

Séquence n° 4 :**Peptide linéaire comportant 13 résidus d'acide aminé**

Asp Val Phe Asn Phe Leu Lys Pro Lys Lys Arg Lys His
 1 5 10

Séquence n° 5 :**ADN synthétique linéaire double brin, comportant 126 paires de bases**

GCT AAA ATC CCG ATT AAG GCA ATT AAA ACT GTG GGC AAA GCT GTT GGT 48
 20 Ala Lys Ile Pro Ile Lys Ala Ile Lys Thr Val Gly Lys Ala Val Gly
 5 10 15
 AAA GGT CTG CGT GCT ATC AAC ATC GCT TCT ACC GCT AAC GAC GTA TTC 96
 25 Lys Gly Leu Arg Ala Ile Asn Ile Ala Ser Thr Ala Asn Asp Val Phe
 20 25 30
 AAC TTC CTG AAA CCG AAG AAA CGT AAA CAC 126
 30 Asn Phe Leu Lys Pro Lys Lys Arg Lys His
 35 40



REVENDICATIONS

- 5 1. Peptide, caractérisé en ce qu'il est représenté par la séquence d'acides aminés appelée "séquence n°1" dans l'annexe intitulée "Séquences de peptides et d'ADN", ou par une séquence d'acides aminés homologue de cette séquence n°1 et comportant, par rapport à celle-ci, une ou plusieurs additions, délétions ou substitutions d'un ou de plusieurs résidus d'acide aminé, et en ce qu'il présente une activité antibactérienne.
- 10 2. Agent antibactérien, caractérisé en ce qu'il contient, en tant qu'ingrédient actif, un peptide conforme à la revendication 1.
- 15 3. Agent antibactérien conforme à la revendication 1, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un agent conservateur alimentaire, d'un agent antibactérien à usage médical, d'un agent de conservation destiné à des matériaux de construction et/ou des peintures, d'un agent antibactérien à usage horticole, d'un agent conservateur destiné à des aliments pour bétail, ou d'un agent conservateur destiné à des aliments pour poissons.
- 20 4. Gène de peptide, caractérisé en ce qu'il code la séquence d'acides aminés appelée "séquence n°1" dans l'annexe intitulée "Séquences de peptides et d'ADN", ou une séquence d'acides aminés homologue de cette séquence n°1 et comportant, par rapport à celle-ci, une ou plusieurs additions, délétions ou substitutions d'un ou de plusieurs résidus d'acide aminé, et en ce que le peptide codé par ce gène présente une activité antibactérienne.
- 25 5. ADN recombiné, caractérisé en ce qu'on peut l'obtenir en insérant le gène de peptide conforme à la revendication 4 dans un ADN vecteur.
- 30 6. ADN recombiné conforme à la revendication 5, caractérisé en ce que l'ADN vecteur est un ADN plasmidique ou un ADN viral.
7. ADN recombiné conforme à la revendication 6, caractérisé en ce que l'ADN vecteur est pMALC2, pGEX-5X-1 ou pXa1.
8. Cellule hôte, caractérisée en ce qu'elle contient un ADN recombiné conforme à l'une des revendications 5 à 6.
9. Cellule hôte conforme à la revendication 8, caractérisée en ce



qu'il s'agit d'une cellule eucaryote.

10. Cellule hôte conforme à la revendication 9, caractérisée en ce que la cellule eucaryote est une cellule animale, une cellule végétale, une cellule d'insecte ou une cellule de levure.

5 11. Cellule hôte, caractérisée en ce qu'elle contient un ADN recombiné conforme à l'une des revendications 5 à 7.

12. Cellule hôte conforme à la revendication 11, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule procaryote.

10 13. Cellule hôte conforme à la revendication 12, caractérisée en ce que la cellule procaryote est une cellule d'*Escherichia coli*.

14. Cellule hôte conforme à la revendication 13, caractérisé en ce qu'il s'agit d'une cellule de la souche JM109 d'*Escherichia coli*.

15 15. Procédé de production d'un peptide conforme à la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comporte le fait de cultiver, dans un milieu, une cellule hôte conforme à l'une des revendications 8 à 14, et le fait de récupérer le peptide dans la culture.

